

Köpek Oositlerinin *In Vitro* Olgunlaştırılmasına BSA ve FCS'nin Etkileri

Mithat EVECEN, Alper BARAN, Serhat ALKAN, Ö. Banu ÖZDAŞ

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, 34850 Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Çağatay TEK

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 34850, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 07.12.2001

Özet: Köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması için medyuma katılan protein kaynaklarının etkisinin incelendiği bu çalışmada, kısırlaştırılmış köpeklerin ovaryumları kullanıldı. Ovaryumlar 38 °C sıcaklıktaki PBS solüsyonu içerisinde, kısırlaştırma işlemini müteakip en geç bir saat içerisinde laboratuara getirildi. Elde edilen oositler üç gruba ayrılarak, % 5 CO₂ ve yüksek nem' in sağlandığı 38,5° C sıcaklıktaki inkübatörde 72 saat olgunlaşmaya bırakıldı.

Grup 1 (Kontrol): TCM -199 medyumunu,

Grup 2 (BSA): % 0,3 BSA katkılı TCM -199 medyumunu,

Grup 3 (FCS): % 5 FCS katkılı TCM -199 medyumunu.

Olgunlaşma süresinin sonunda, oositlerin tümü pipetleterek kumulus hücrelerinden arındırıldı ve 1:3 asetik asit:etanol ile 48 saat fikse edildi. Oositler % 2 aseto-orsein ile boyandıktan sonra olgunlaşma kriterleri açısından faz-kontrast mikroskopta x400 büyütmede incelendi.

Toplam 624 oositin kullanıldığı çalışmada kontrol, BSA ve FCS gruplarında sırasıyla ; %16,58 (34/205), %37,08 (79/213) ve %22,81 (47/206) oositin meyotik bölünmeye devam ettiği saptandı. BSA grubunda meyotik bölünmeye devam eden oosit oranının hem FCS, hem de kontrol grubuna göre önemli olduğu ($p<0,05$), FCS grubunda elde edilen oranın ise, kontrol grubuna göre önemli olduğu ($p<0,05$) belirlendi.

Bu verilere göre, köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması amacıyla medyuma protein katılmasının gerekli olduğu ve bu amaçla, BSA'nın FCS'ya göre daha iyi sonuçlar verdiği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Dişi Köpek, Oosit, *In Vitro* Olgunlaşma, BSA, FCS

The Effects of BSA and FCS on *In Vitro* Maturation of Bitch Oocytes

Abstract: The effects of protein sources added to the medium for maturation of bitch oocytes were investigated. Ovaries from spayed bitches were transported to the laboratory in PBS at 38 °C within an hour. Recovered oocytes were divided into three groups and left for 72 h maturation at 38.5 °C under an atmosphere of 5% CO₂ and high humidity.

Group 1 (Control): TCM 199 medium,

Group 2 (BSA): TCM 199 medium supplemented with 0.3% BSA,

Group 3 (FCS): TCM 199 medium supplemented with 5% FCS.

At the end of the maturation period, all oocytes were denuded from cumulus cells by pipetting and fixed in 1:3 acetic acid: ethanol solution for 48 h. The oocytes were then stained with 2% aceto-orsein and examined under a phased-contrast microscope at x400 magnification for maturation criteria.

It was observed that 16.58% (34/205), 37.08% (79/213) and 22.81% (47/206) of the oocytes resumed meiosis in the control, BSA and FCS groups, respectively; a total number of 624 oocytes were used. In the BSA group, the rate of oocytes that resumed meiosis was significant ($p < 0.05$) compared to the FCS and control groups. This rate was also significant ($p < 0.05$) in the FCS group compared to the control group.

According to these results, it can be suggested that addition of protein sources to the medium for *in vitro* maturation of bitch oocytes is necessarily important, and BSA gives better results than FCS does.

Key Words: Bitch, Oocyte, *In Vitro* Maturation, BSA, FCS

Giriş

Köpeklerde yardımcı üreme tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar, son yıllarda özellikle nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya bulunan köpeğiller için iyi bir model oluşturabilecek olan evcil köpekler üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır (1-5).

In vivo ortamda fertilize olmuş embriyoların alıcı annelere transferi ile, 1980 yılında köpeklerde ilk başarılı embriyo transferinin gerçekleştirilmesinden sonra (6), 1988 yılında ilk defa, *in vivo* olgunlaşmış oositler kullanılarak, *in vitro* fertilize edilen köpek embriyolarının ovidukt'a transferi yoluyla köpek yavruları elde edilmiştir (7).

In vitro fertilizasyon teknikleri ile kısırlaştırılan veya hastalık ve benzeri nedenlerden dolayı ölmek üzere olan köpeklerin ovaryumlarından, embriyo elde edilmesi son yıllarda mümkün olabilmektedir (7).

Köpeklerde reproduktif mekanizma diğer memelilerden farklıdır. Dişi köpeklerde oositler, Germinal Vezikül döneminde ovule olur ve fertilize olabilmeleri için de ovidukt'ta 72 saatlik bir olgunlaşma süresine ihtiyaç gösterirler (8,9,10).

Memeli oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması çalışmalarında oositlerin protein gereksinimleri olduğu bilinmektedir (8,9,11). Araştırmacılar memeli oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması çalışmalarında, medyuma çeşitli tip ve oranlarda protein kaynakları katmayı denemiş ve değişik sonuçlar elde etmişlerdir (3,7,12,13,14).

Köpek oositlerinin *in vitro* maturasyonu çalışmalarında da medyuma protein katılmasının gerekliliği konusunda araştırmacılar arasında bir fikir birliği mevcuttur (3,7,14). Ancak, optimal sonucun elde edilebilmesi için bunun hangi kaynaklardan sağlanması ve hangi oranlarda kullanılması gerektiği konusu, araştırmacıların üzerinde halen çalışmalar yaptığı bir konudur (3,15,16).

Bu alandaki çalışmaların çok yeni olması, istenilen düzeyde başarılı sonuçların alınamaması ve standart bir yöntemin henüz geliştirilememiş olması, bu konudaki çalışmalara daha fazla eğilmek gerekliliğini doğurmaktadır (3,7,16-19).

Bu nedenle, sunulan çalışmada köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasına Hepses modifikasyonlu TCM 199 medyumuna protein kaynağı olarak ilave edilen % 0,3 BSA ve % 5 FCS'un etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Ovario-histerekтоми yapılmış köpeklerden alınan ovaryumlar, +38,5 °C'deki antibiyotik katkılı (Gentamisin Sülfat, 50 µg/mL) PBS solüsyonunda 2 saat içerisinde laboratuvar ortamına getirildi. Ovaryumların yüzeyine bisturi yardımıyla kesitler atılmak suretiyle 38 °C'deki Hepses modifikasyonlu TCM 199 (Sigma, M 2550) solüsyonu yardımıyla saat camı içerisinde yıkandı. Hemen ardından aynı medyumunu içeren yıkama petrilere aktarılan oositler burada 3 kere pasajlanarak yıkandılar. *In vitro* olgunlaştırma için ayrılacak oositlerin seçiminde; sağlam bir zona pellusida, en az 4 sıra kumulus hücresi, homojen ve zona içini dolduran koyu renkli vitellus varlığı kriterleri göz önünde tutuldu (2,17,20) (Şekil 1).

Her üç çalışma grubu için en az 2 saat öncesinden hazırlanmış, üzerleri mineral yağ (Sigma) ile örtülmüş, antibiyotik katılmış (Gentamisin Sülfat, 50mg/mL) ve 38 °C'lik sıcaklık ve % 5 CO₂'li inkübatör ortamında bekletilmiş bulunan üç farklı olgunlaştırma medyumunu (Hepses Modifikasyonlu TCM 199, Sigma M-2520) gruplarına aktarıldı.

Kazanılan oositler, 1. Grup (Kontrol): TCM 199+ 2,2 gr/lit NaHCO₃+0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol),

2. Grup (BSA): TCM 199+% 0.3 BSA (Fraction V , Sigma A8806)+2,2 gr/lit NaHCO₃+ 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol) ve

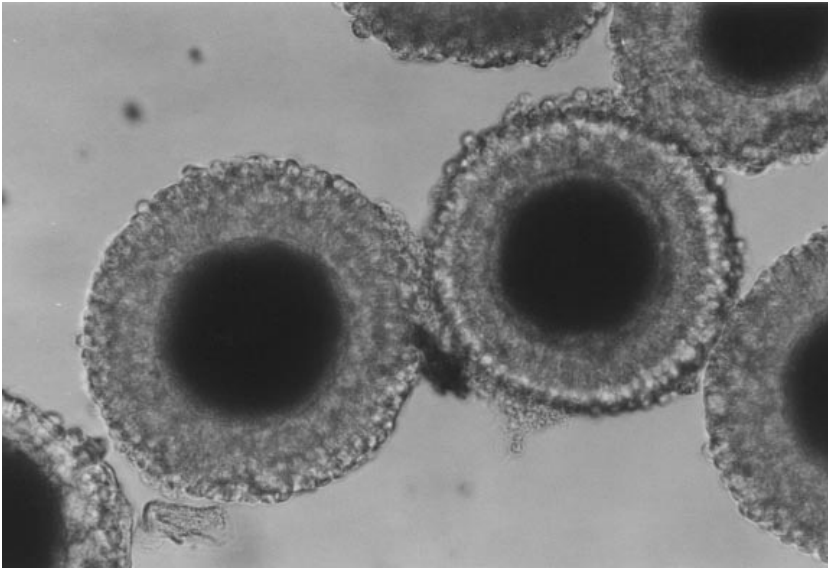
3. Grup (FCS): TCM 199 + % 5 FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom S 0115)+2,2 gr/lit NaHCO₃+ 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol), % 5 CO₂ ve % 100'e yakın nem'in sağlandığı 38,5 °C'lik inkübatör ortamında 72 saat olgunlaştırıldı. Sonra 4'lü petri kutularının (Nunc 176740) her bir gözü (well) içerisine 350 µl medyum konuldu. Her bir göze 10-20 oosit düşecek şekilde yerleştirildi. Ardından her bir gözün üzeri 150 µl mineral yağ ile örtülerek olgunlaşmaya bırakıldı. Olgunlaşma süresinin sonunda, oositlerin kumulus hücreleri pastör pipeti yardımıyla mekanik olarak uzaklaştırıldı. Ardından % 0,7'lik KCl solüsyonunda 3-5 dakika bekletildikten sonra lam-lamel arasında sıkıştırılarak sabitlendi. 1:3 asetik asit-etanol solüsyonu içerisinde 48 saat fikse edilen preparatlar, % 2'lik aseto-orsein ile boyandıktan sonra faz-kontrast mikroskopta x 400 büyütmede kromatin ve kromozom yapıları gözlenmek sureti ile olgunlaşma durumları saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan X² (Chi-kare) testi kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular

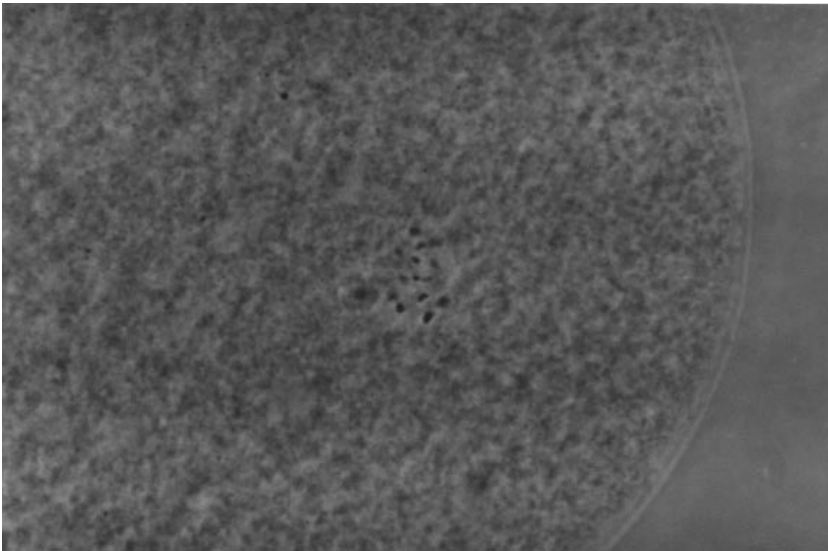
Araştırma süresince 10 kez tekrarlanan çalışmada 17 adet dişi köpekten, toplam 733 adet oosit toplandı. Değerlendirmeye uygun olduğu saptanan (Şekil 1) 624 adet oositin olgunlaştırıldığı Kontrol grubunda (n=205), Germinal Vezikül, Diakinez, Metafaz I (Şekil 2), Anafaz I, Telofaz I, Metafaz II (Şekil 3), Tanımlanamayan çekirdek materyali (Undetermined Nuclear Materyal: UDNM) ve Dejenere oosit sayı ve oranları sırasıyla; 106 (% 51,70), 29 (% 14,14), 3 (% 1,46), 0 (% 0,00), 2 (% 0,97), 0 (% 0,00), 29 (% 14,14), 36 (% 17,56) olarak saptandı. Aynı değerler % 0,3 BSA içeren TCM 199 grubunda (n=213); 93 (% 43,66), 20 (% 9,39), 35 (% 16,43), 2

(% 0,94), 2 (% 0,94), 20 (% 9,39), 26 (% 12,20) ve 15 (% 7,04) olurken, TCM 199+% 5 FCS grubunda ise (n=206); 100 (% 48,54), 26 (% 12,62), 15 (% 7,28), 0 (% 0,00), 2 (% 0,97), 4 (% 1,94), 28 (% 13,59) ve 31 (% 15,05) olarak saptandı (Tablo 1).

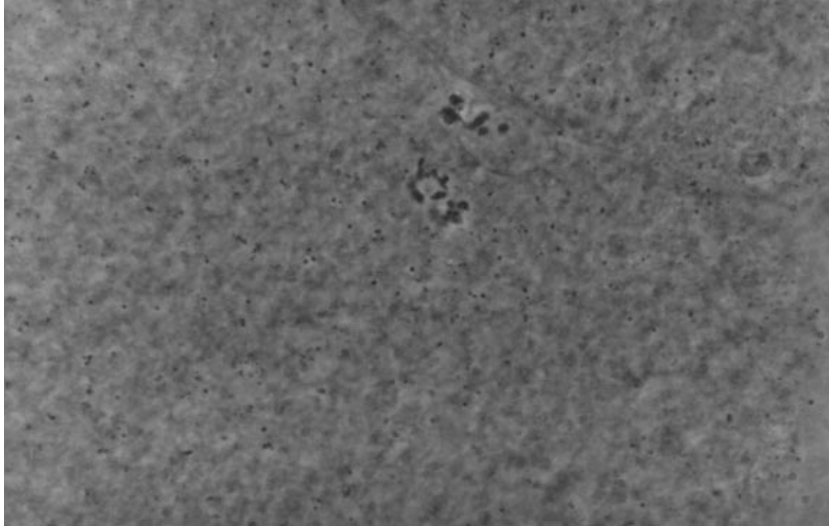
Gruplar arasında 72 saat süren olgunlaşma süresinin sonunda belirlenen Germinal Vezikül, Diakinez, Anafaz I, Telofaz I ve UDNM oranları bakımından istatistiksel olarak herhangi bir farka rastlanmadı. Ancak, M I ve M II'ye gelişen oosit oranları arasında yapılan değerlendirmede, her iki parametre açısından da % 0,3 BSA grubunda saptanan en yüksek değerlerin (% 16,43-% 9,39), % 5 FCS grubundakilere (% 7,27-% 1,94) ve



Şekil 1. Olgunlaştırılmaya Alınmak Üzere Seçilen Primer oositler (x200 Büyütme).



Şekil 2. Metafaz I Aşamasındaki Bir Oosit (x400 Büyütme).



Şekil 3. Metafaz II Aşamasındaki Bir Oosit (x400 Büyütme).

Tablo 1. Köpek Oositlerinin 72 Saatlik *In Vitro* Olgunlaştırma Sonrası Ulaştıkları Gelişim Safhaları ve Oranları.

Gruplar	GV (%)	Diak. (%)	M I (%)	A I (%)	T I (%)	M II (%)	UDNM (%)	Dej. (%)
Kontrol TCM 199 n=205	106 (51,70) ^a	29 (14,14) ^a	3 (1,46) ^c	0 (0,00) ^a	2 (0,97) ^a	0 (0,00) ^c	29 (14,14) ^a	36 (17,56) ^a
TCM 199 +% 0.3 BSA n=213	93 (43,66) ^a	20 (9,39) ^a	35 (16,43) ^a	2 (0,94) ^a	2 (0,94) ^a	20 (9,39) ^a	26 (12,20) ^a	15 (7,04) ^b
TCM 199 +% 5 FCS n=206	100 (48,54) ^a	26 (12,62) ^a	15 (7,28) ^b	0 (0,00) ^a	2 (0,97) ^a	4 (1,94) ^b	28 (13,59) ^a	31 (15,05) ^a

GV: Germinal Vezikül, Diak.: Diakinez, M I: Metafaz I, A I: Anafaz I, T I: Telofaz I, M II: Metafaz II, UDNM: Undetermined Nuclear Material (Belirlenemeyen Çekirdek Materyali), Dej.: Dejenere.

^{a,b,c} Dikey kolonlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir $p < 0,05$. (X^2 testi)

bu değerlerin de, Kontrol grubuna (% 1,46 - % 0,00) göre önem teşkil edecek derecede yüksek oldukları saptandı ($p < 0,05$). Bunun yanı sıra, gelişemeyerek dejenere olmuş oosit oranları bakımından Kontrol (% 17,56) ve % 5 FCS katkılı gruptaki (% 15,05) değerler arasında bir fark bulunmazken; % 0,3 BSA grubunda saptanan değer (% 7,04) bu iki grubun değerleri ile önem teşkil edecek şekilde düşük olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 1).

Kontrol, % 0,3 BSA ve % 5 FCS katkılı gruplarda sırasıyla; 34 (% 16,58), 79 (% 37,08) ve 47 (% 22,81) oositin meiotik bölünmeye devam ettiği (Diak.+ M I + A I + T I + M II) gözlemlendi (Tablo 2). Yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda, % 0,3 BSA katkılı grupta saptanan en yüksek değer, diğer iki gruptaki değerlere ve % 5 FCS

Tablo 2. 72 Saatlik *In Vitro* Olgunlaştırma Sonrasında Meiotik Bölünme Aktivasyonu Gösteren Oositlerin Oranları.

Gruplar	Mayoza Devam Edenler (Diak.+ M I+ A I+T I+ M II) (%)
Kontrol	34
TCM 199	(16,58) ^c
TCM 199 +% 0.3 BSA	(37,08) ^a
TCM 199 +% 5 FCS	(22,81) ^b

^{a,b,c} Dikey kolonlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir $p < 0,05$. (X^2 testi)

(Diak: Diakinez, M I: Metafaz I, A I: Anafaz I, T I: Telofaz I, M II: Metafaz II)

katkılı gruptaki değerlerin de kontrol grubundaki değere nazaran istatistiksel açıdan önem taşıdığı saptandı ($p<0,05$).

Tartışma

Kısırlaştırılmış köpeklerin ovaryumlarından elde edilen primer oositlerin *in vitro* olgunlaştırıldıkları bu çalışmada, meyotik bölünmeye devam eden oosit oranları (Diak.+M1+AI+T1+MII) yönünden saptanan en yüksek değer % 37,08 ile BSA katkılu grupta belirlendi. Bu değer, çalışmalarında aynı miktarda BSA kullanan Hewitt ve England (3)'ün buldukları % 21'lik değerlerinin oldukça üzerinde, Hewitt ve England (2)'in % 28-60'lık değerlerine ise yakın bulundu. Ancak Otoi ve ark. (1)'nin buldukları % 73'lük değerlerin oldukça altında kaldı.

Çalışmada 1. meyotik bölünmeyi tamamlamış (M II) olduğu saptanan oositlerin oranları yönünden yapılan istatistiksel karşılaştırmada; BSA grubunda saptanan % 9,39'luk değerle, FCS grubunda bulunan % 1,94'lük değer ve bu iki değer ile, hiç M II gelişimi kaydedilemeyen kontrol grubundaki % 0,00'lık değer arasındaki farkların önemli olduğu belirlendi ($p<0,05$). Çalışmada elde edilen % 9,39'luk en yüksek M II oranının, Fujii ve ark. (5)'nin buldukları % 11'lik oranın biraz altında, Otoi ve ark. (16)'nın % 2,3-16,3'lük oranlarına benzer ve Nickson ve ark. (14)'nin % 39'luk değerlerinin ise oldukça altında kaldığı saptandı.

Sunulan çalışmada, en yüksek meyotik aktivasyon oranlarının BSA katkılu grupta saptanmış olması, Hewitt ve England (3)'ün köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması çalışmalarında BSA'nın FCS'a göre daha üstün olduğunu bildiren çalışmasıyla paralellik taşımaktadır. Çalışmada, medyuma % 5 FCS katılan grupta elde edilen % 22,21'lik meyotik aktivasyon oranı, Hewitt ve England (3)'ün aynı miktarda FCS içeren grubunda buldukları % 19'luk değerinden az da olsa üzerinde gerçekleşti. Buna karşın % 0,3 BSA grubu için elde ettiğimiz % 37,08'lik meyotik aktivasyon oranı aynı araştırmacıların (3), aynı miktarda BSA içeren grupları için buldukları % 67'lik sonucun bir hayli altında kaldı. Çalışmanın % 5 FCS katkılu grubunda elde ettiğimiz % 1,94'lük M II oranı, çalışmalarına medyuma % 20 oranında FCS katan Saint-Dizier ve ark. (10)'nin, % 2,1'lik M II değerlerine yakın bulundu. Aynı araştırmacıların

(10) FCS gruplarına ait olan bu bulguları, köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasında protein kaynağı olarak yüksek konsantrasyonlu (% 20) FCS'nin optimal sonuçlar vereceğini bildiren Hewitt ve England (3)'ün bulgularıyla bağdaşmamaktadır.

Çalışmanın protein içermeyen kontrol grubunda hiçbir oositin M II aşamasına gelişmemiş olması, köpek oositlerinin *in vitro* ortamda mayotik olgunlaşma için protein kaynağına gereksinim duyduklarını bildiren araştırmacıların bulgularıyla bağdaşmaktadır (2, 21).

Otoi ve ark. (1), olgunlaştırma için seçilecek oositlerin morfolojik görünüşleri ve sahip oldukları kumulus hücre sırasının yanı sıra, çaplarının da sonuçları etkileyen kritik bir faktör olduğunu ve 120 μ 'dan büyük çapa sahip oositlerin kullanmasının oositlerin meyotik olgunlaşmaları açısından önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra Hewitt ve England (3), ovaryum vericisi olan köpeklerin yaşının da olgunlaşmayı etkileyen bir faktör olduğunu, ideal olarak 1-6 yaşları arasındaki köpeklerin tercih edilmesi gerektiğini ve 7 yaşın üzerindeki köpeklerden kazanılan oositlerin olgunlaşma sonuçlarında düşüşlere yol açtığını bildirmişlerdir. Çalışmada, köpeklerin yaşları ile kullanılan oositlerin çaplarının dikkate alınmamasının, M II'ye ulaşan oosit oranlarının düşük kalmasına neden olabileceğini düşündürmüştür.

Otoi ve ark. (16), farklı östrus dönemlerindeki köpeklerin kan serumlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında, en yüksek M II oranını (% 16,3) östrustaki köpek serumunu % 10 oranında kattıkları grupta elde etmişlerdir. Buna paralel olarak, Nickson ve ark. (14) da medyuma aynı proteini yine aynı miktarda katarak yaptıkları çalışmalarında % 39'luk bir M II oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız her iki protein kaynağı da bu ikisinden daha düşük sonuçlar doğurmuştur.

Sunulan çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda, köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması çalışmalarında medyuma protein katılmasının gerekli olduğu; bunun yanı sıra, olgunlaşmayı desteklemesi açısından protein kaynağı olarak % 0,3 BSA'nın, % 5 FCS'a nazaran daha etkili olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak; henüz çok yeni bir geçmişe sahip olan köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması çalışmaları alanında daha bir çok temel çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Otoi, T., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A., Suzuki, T.: Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, 2000; 54: 535-542.
2. Hewitt, D.A., England, G.C.W.: The canine oocyte penetration assay: its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 1997; 50: 123-139.
3. Hewitt, D.A., England, G.C.W.: The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 1998; 49: 957-966.
4. Luvoni, G.C.: Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2000; 40: 505-512.
5. Fujii, M., Otoi, T., Murakami, M., Tanaka, M., Une, S., Suzuki, T.: The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000; 62: 305-307.
6. Tsutsui, T., Shimada, K., Nishi, M., Kubo, N., Muraio, I., Shimizu, T., Ogasa, A.: An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 1989; 51: 797-800.
7. Goodrowe, K.L., Walker, S.L., Ryckman, D.P., Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Bateman, H.L., Waddell, W.T.: Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000; 60-61: 389-403.
8. Hafez, E.S.E.: Embryo Transfer, IVF and Genetic Engineering. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger, 535-538, Philadelphia, 1987.
9. Wassarman, P.M., Albertini, D.F.: *The Mammalian Ovum. The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, 79-188: 1994.
10. Saint-Dizier, M., Renard, J.P., Chatant-Maillard, S.: Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 2001; 121: 97-105.
11. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E.: *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 38-39, 1994.
12. Pabuççuoğlu, S.: Sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasında HEPES ve hormonların etkileri. *İst. Vet. Fak. Derg.*, 2001; 27: 659-670.
13. Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Ak, K., Alkan, S., Evecen, M., Öztürkler, Y., İleri, I.K.: Effects of serum and hormone additions to maturation medium on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *İst. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1999; 25: 75-79.
14. Nickson, D.A., Boyd, J.S., Eckersall, P.D., Ferguson, J.M., Harvey, M.J., Renton, J.: Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation *in vitro* fertilization in bitches. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1993; 47: 231-240.
15. Hewitt, D.A., England, G.C.W.: Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 1999; 55: 63-75.
16. Otoi, T., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A., Suzuki, T.: Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Fert. Dev.*, 1999; 11: 387-390.
17. Farstad, W.: Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 2000; 53: 175-186.
18. Hewitt, D.A., Watson, P.F., England, G.C.W.: Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, 1998; 49: 1083-1101.
19. Bolamba, D., Borden-Russ, K.D., Durrant, B.S.: *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 1998; 49: 933-942.
20. Concannon, P.W.: *Reproduction in Domestic Animals*. In: *Reproduction in the dog and cat*. Chapter 16, Ed: Perry T. Cupps, Academic Press, California, 549: 1991.
21. Robertson, J.B., Srsen, V., King, W.A.: Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured *in vitro*. 1992, XIIth Anim. Reprod. Congr., Vol.4, 1808-1810, the Hague.